

# モルモット血清によるタンニン酸処置 赤血球凝集現象に関する研究

## 第 4 報

タンニン酸処置赤血球凝集反応に対するイオンの影響について

金沢大学結核研究所薬理部（主任：伊藤亮教授）

上 野 良 雄

（受付：昭和39年6月20日）

## 緒 言

伊藤等<sup>1)</sup>はモルモット血清によるタンニン酸処置赤血球 (TE) 凝集反応に関する研究報告の中で、血清を陽イオン交換樹脂で処置するとその TE 凝集活性が消失することを述べている。その後、山崎<sup>2)</sup>は金属キレート試薬である Et-hylenediamine tetracetic acid (EDTA) が TE 凝集反応を阻止することを観察した。これらの事実は一見 TE 凝集反応に Cation の必要性を示唆したものと解されるのである。ところが伊藤等の実験では血清活性が非透析性であり、しかも樹脂処置によつて失活した血清が  $\text{Ca}^{++}$  や  $\text{Mg}^{++}$  イオンによつて復活しなかつたこと、ま

た山崎の実験でもクエン酸には全然阻止作用がなかつたことから、これらの実験で観察された失活や阻止が直ちに、TE 凝集反応の Cofactor としてイオンが必要であることを示すものとは言い得ない。のみならず伊藤等<sup>3)</sup>はごく最近  $\text{Mn}^{++}$  イオンが TE 凝集反応に対してある条件でははなはだ強力な阻止作用を示すことを観察した。そこで著者は TE 凝集反応におけるイオンの意義を明らかにする目的をもつて、TE 凝集反応に対する種々のイオンの影響について検索した。ここにその成績を報告する。

## 実 験 方 法

緩衝液を除いては実験方法はすべて前回報告<sup>1,2)</sup>の記載に従つた。ただし本研究に用いた蒸留水はイオン交換樹脂柱（日本オルガノ商会製モノベツト型純水製造装置）を通して再精したものであり、またガラス器具には硬質ガラス製のものを用いた。

### 1. 緩衝液加生理的食塩水

従来使用している磷酸塩は本研究では緩衝液として不適当であるので、これに代わるものとして種々検討した結果 0.1 M Veronal-HCl 混液、pH 7.0、が適当であることがわかつた。そこで本研究では0.85%食塩水10容量に Veronal-HCl 緩衝液 1 容量を加えたも

のを緩衝液加生理的食塩水（以下単に食塩水と呼ぶ）として用いた。

### 2. タンニン酸処置赤血球

健常モルモット（500—700 gm）から心臓穿刺で採つた血液を直ちに 1.2 容量の Alsever 氏液<sup>4)</sup>に混和する。次いで遠心分離した赤血球を 4 回食塩水で洗滌した後、食塩水を加えて原血液量とする。その後の操作はすべて低温室（ $2^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ）内で行なわれた。洗滌赤血球 2 ml をタンニン酸の 1:10,000 溶液（食塩水に溶解）40 ml に混和し低温室内で 30 分間放置する。次ぎに赤血球を食塩水で 3 回洗滌し、最後に食塩水を加え

て 2 ml とする.

### 3. 血清

人型結核菌 H37Rv 0.5 mg を皮下接種して1月以上経過した結核感染モルモットから心臓穿刺で採血し, 血液を室温で凝固させ, 血清を分離して 5°C 以下で保存した. 実験に際しては, 血清をその TE 凝集力に応じて適宜稀釈 (1:100-1:500) して使用した.

### 4. TE 凝集反応

被検物質の2倍通下稀釈液 2 ml に血清稀釈液 2 ml を混和し, これをタンニン酸処置赤血球浮游液 0.2 ml を容れた遠心沈降管 (12 mm × 100 mm) に加えてよく混和した後室温に25分間放置した. その間5分毎に

成績を判定し, 凝集反応の程度を次のように区分して記録した: Ⅲ, 赤血球は殆んど全部凝集して管底に沈積した; Ⅱ, 赤血球は凝集を起しているが管底に沈積するに至らなかった; Ⅰ, Ⅱ, +, 凝集して管底に沈積した赤血球の量によつて区分した.

### 5. 被検物質

塩類: 一級試薬品.

Strophanthin K: Nutritional Biochemicals Corp., U. S. A.

Ouabain: Nutritional Biochemicals Corp., U. S. A. 及び Merck, Germany.

## 実 験 成 績

### 1. 1価 Cation の影響

第1表は TE 凝集反応に対する1価 Cation の影響を検索するために, LiCl, KCl, RbCl, CsCl 及び NH<sub>4</sub>Cl を 10<sup>-1</sup>M ないし 10<sup>-3</sup>M に血清に加えて行なった TE 凝集試験の成績を示したものである. この表から明らかなように, これら1価 Cation は低濃度ではすべて TE 凝集反応に対して何ら影響を示さなかつたが, 高濃度では Cs<sup>+</sup> イオンを除いて, 凝集反応を多少とも増強する傾向が認められた. 即ち, 対照管における凝集反応の程度は (±) であつたのに, Li<sup>+</sup> イオンを 10<sup>-1</sup>M 及び 5×10<sup>-2</sup>M に加えた試験管では (Ⅲ), 2×10<sup>-2</sup>M 及び 10<sup>-2</sup>M に加えたものでは (+) であつた. また NH<sub>4</sub><sup>+</sup> イオン実験では 10<sup>-1</sup>M ないし 2×10<sup>-2</sup>M に加えた場合には (Ⅲ), 10<sup>-2</sup>M 及び 5×10<sup>-3</sup>M に加えた場合には (Ⅱ) と, 何れも対照管に比して著しく強い凝集反応を示した. K<sup>+</sup> イオンならびに Rb<sup>+</sup> イオンでもほぼ同様の結果が得られた. しかし Cs<sup>+</sup> イオンでは上記 Cation のような増強作用は殆んど見られず, むしろ高濃度では凝集反応が抑制される傾向が認められたのである. なおここに表示しなかつたが, これら1価 Cation はそれ自体はタンニン酸処置赤血球に対して 10<sup>-1</sup>M 濃度でも全く凝集作用がなかつた.

### 2. 2価 Cation の影響

第2表は Mg<sup>++</sup>, Ca<sup>++</sup>, Sr<sup>++</sup> 及び Ba<sup>++</sup> イオン等の2価 Cation の TE 凝集反応に対する影響を各塩酸塩 (10<sup>-1</sup>M-10<sup>-4</sup>M) についてしらべた実験成績である. ここで先ず最初に注目されることは, 1価 Cation の場合と異なつて, これら2価 Cation が何れも高濃度域において TE 凝集反応に対し著明な阻止作用を示したことである. 阻止作用の程度は Cation の種類や, その時使用した血清の凝集力によつて多少違つており, この実験では4者のうち Ca<sup>++</sup> イオンが最強で, 5×10<sup>-3</sup>M まで完全阻止効果を發揮した. その他の Cation では 2×10<sup>-2</sup>M まで阻止効果が認められた. 次ぎに注目すべきことは, これら2価 Cation がある濃度ではこのような阻止作用とは逆に増強的影響を呈したことであつて, 第2表の成績では Sr<sup>++</sup> イオン (10<sup>-2</sup>M-10<sup>-3</sup>M) において最も著明であり, Mg<sup>++</sup> イオン (5×10<sup>-3</sup>M-2×10<sup>-3</sup>M) 及び Ca<sup>++</sup> イオン (10<sup>-2</sup>M-5×10<sup>-4</sup>M) でこの傾向が認められた.

更に第3表の実験成績は TE 凝集反応に対する2価 Cation の増強作用を極めて端的に示したものである. この実験では凝集反応が丁度消失する程度に稀釈した血清を用いて, これに2価 Cation の通下稀釈液を加えて TE 凝集試験を

行なつたのであつて、対照管では凝集反応は全く陰性であつたにも拘わらず、2価 Cation を  $2 \times 10^{-2} M$  ないし  $2 \times 10^{-3} M$  に加えた試験管では(±)ないし(++)程度の凝集反応(この実験では  $Sr^{++}$  イオンが最も強い反応を呈した)を生じたのである。言うまでもなく2価 Cation それ自体はタンニン酸処置赤血球に対し全く凝集作用を有しないのであつて、このことは表の血清を加えない対照試験管列では全管陰性であつたことから明らかである。

以上の実験結果から、2価 Cation の TE 凝集反応に対する影響は1価 Cation のように単純ではなくて、濃度によつて阻止及び増強の相反する2作用を呈して2相性(diphasic)であることが実証された。

### 3. Anion の影響

前2項実験では各種 Cation の TE 凝集反応に対する影響を精査したのであるが、他方 Anion の影響を明らかにするために Mg, K, 及び  $NH_4$  の種々の塩類をもつて比較実験を行なつた。

第4表は Mg, K ならびに  $NH_4$  の各塩酸塩、硫酸塩及び硝酸塩について TE 凝集反応に対する影響を比較した実験成績であつて、この表から次のことが明らかである。

a) Mg 塩類では、Anion が  $Cl^-$  イオンでも  $SO_4^{--}$  イオンでも全く同程度の阻止作用が示された。

b) 前項の塩化物実験で認められた  $K^+$  イオンや  $NH_4^+$  イオンの高濃度における TE 凝集反応増強作用は、硫酸塩及び硝酸塩の場合にも同じく認めることができた。

第5表は  $Cl^-$ ,  $Br^-$ ,  $I^-$ ,  $SO_4^{--}$ ,  $NO_3^-$ ,  $NO_2^-$ ,  $ClO_3^-$ ,  $SCN^-$  及び  $CH_3COO^-$  イオン等の Anion の影響をカリウム塩について比較検討した実験成績である。この表の成績から明らかなように、Anion を異にしたこれら多数のカリウム塩類が、KSCN を除いて、TE 凝集反応に対する影響に関しては、多少の程度の差こそあれ、KCl と全く同様の態度、即ち高濃度 ( $10^{-1} M - 2 \times 10^{-2} M$ ) における凝集反応増強効果、を示した

ことははなはだ興味あることである。ただし KSCN のみはこのような増強作用を全然呈しなかつたのであるが、このことは恐らく  $SCN^-$  イオンの特性によるものであろう。

以上の結果から TE 凝集反応に対する Anion の影響は Cation のそれに比してはなはだ意義の少ないものといふことができる。

### 4. 1価 Cation と2価 Cation の併用による影響

上記の実験結果から TE 凝集反応に対する Cation の影響は、1価イオンと2価イオンとでは趣きを異にしており、前者では高濃度で多少増強的影響が認められるのに対して、後者では明らかに阻止作用を呈することが示された。そこで両者を同時に作用させた場合に TE 凝集反応に如何なる影響が現われるかについて更に実験を行なつた。

第6表は1価イオンとして  $K^+$  イオンと  $NH_4^+$  イオン、2価イオンとして  $Ca^{++}$  イオンと  $Mg^{++}$  イオンを選び、兩種イオン(何れも塩酸塩として)を等分子量に相互に組み合せた混合液の各々について TE 凝集反応に対する影響をしらべた成績である。この表から明らかなように、1価及び2価 Cation の何れの組み合わせの場合でも、高濃度域 ( $10^{-1} M - 5 \times 10^{-2} M$ ) において強い阻止作用が現われたのであつて、しかもその阻止作用の程度は  $Ca^{++}$  イオン及び  $Mg^{++}$  イオンの単独作用時に見られる阻止効果とはほぼ同程度であつた。なおまた更に濃度を低下すると軽微ではあるが増強的效果も現われて、2価 Cation の特長である2相性影響も認められた。

以上の成績は、1価 Cation と2価 Cation の併用時には1価イオンの増強的影響が優勢な2価イオンの阻止的影響によつて抑圧されることを示している。

### 5. 強心配糖体の影響

上記の諸実験によつて明らかとなつた Cation の TE 凝集反応に対する影響性が、これらイオンの細胞膜透過性と関係ありや否や? この問題は一面 TE 凝集反応の機序とも関連してい

て、極めて重要な意義をもつものと考えられるので、著者はここに、細胞膜のイオン透過性に影響を与える数種の薬物について、TE凝集反応に対する影響を検討した。中でも Digitalis 類の強心配糖体は、心筋、赤血球及びその他の細胞について、 $\text{Na}^+$  イオン及び  $\text{K}^+$  イオンの細胞膜透過性、特にこれら Cation の active transport に対し強力な阻止作用を示すことが最近の研究によつて明らかとなり、この性能が Digitalis 強心作用の直接原因と考えられるに至っている<sup>9)</sup>。そこで先ず最初に強心配糖体についてTE凝集反応に対する直接的影響及び Cation 作用に対する強心配糖体の影響の2点に関して検索を行なつた。

#### a) Ouabain ならびに K-Strophanthin の TE 凝集反応に対する影響

第7表は TE 凝集反応に対する Ouabain 及び K-Strophanthin の影響を検索した実験成績であるが、意外にもこの2つの強心配糖体が互いに異なつた態度を示したのである。即ち Ouabain は使用した濃度範囲内 ( $2 \times 10^{-3} \text{M} - 10^{-5} \text{M}$ ) では TE 凝集反応に対し何ら影響を及ぼさなかつたのであるが、他方 K-Strophanthin は  $2 \times 10^{-3} \text{M} - 10^{-3} \text{M}$  の範囲では TE 凝集反応を完全に抑制し、更にこの実験では  $5 \times 10^{-5} \text{M}$  の濃度までも阻止の影響を認めることができたのである。Ouabain については異なる会社の2製品をもつて実験を反復したが全く同一成績が得られた。この結果から、K-Strophanthin 標品に見られた TE 凝集反応阻止作用は、強心配糖体の固有の薬理作用とは直接関係がないと考えられるのである。この点を更に検討するために次の実験を行なつた。

#### b) 強心配糖体と Cation との相互的影響

第8表は  $10^{-2} \text{M}$ 、及び  $10^{-4} \text{M}$  の KCl の存在下において K-Strophanthin の影響をしらべた実験成績であるが、この表から明らかなように、 $\text{K}^+$  イオンの有無に拘わらず、すべての実験において K-Strophanthin は  $5 \times 10^{-2} \text{M} - 5 \times 10^{-4} \text{M}$  の範囲内で TE 凝集反応を完全に阻

止した。また一方第9表の実験成績は  $5 \times 10^{-4} \text{M}$  に Ouabain を加えた食塩水を用いて、 $\text{CaCl}_2$  ならびに KCl の TE 凝集反応に対する影響をしらべたものである。ここでも TE 凝集反応に対する  $\text{Ca}^{++}$  イオンの抑制作用ならびに、 $\text{K}^+$  イオンの増強作用は、Ouabain の存在によつて何ら影響を受けるようなことはなかつた。

以上の実験結果から、TE凝集反応に対する影響性に関しては、強心配糖体と Cation との間には関連性のないことがうかがえるのであつて、従つて K-Strophanthin の示した阻止作用は、強心作用とは異なつて、Cation の細胞膜透過性に関係しないこの薬物の特性によるものと言わねばならない。

#### 6. 抗ヒスタミン剤, Procaine 及び Quinidine の影響

前項において赤血球の  $\text{K}^+$  イオン及び  $\text{Na}^+$  イオンの active transport に対する強力な阻害剤である強心配糖体の影響について検討したのであるが、細胞膜の Cation の active transport を阻害する薬物として知られているものに、強心配糖体以外に、抗ヒスタミン剤<sup>10)</sup>、Procaine 及び Quinidine<sup>11)</sup> がある。そこでこれら薬物の TE 凝集反応に対する影響についても検索を行なつた。

実験の結果は第10表に示したように、被検薬物のすべてにおいて、程度の差こそあれ多少とも TE 凝集反応に対する阻止作用が認められた。即ち抗ヒスタミン剤では Promethazine が  $2 \times 10^{-3} \text{M} - 2 \times 10^{-4} \text{M}$  の範囲内で完全阻止を示し最も強く、Dimenhydrinate, Diphenhydramine 及び Chlorhetramine はこれよりやや弱く、それらの最小有効阻止濃度は何れも大体  $10^{-3} \text{M}$  であつた。また Quinidine は抗ヒスタミン剤とはほぼ同程度の阻止作用を示し、その最小有効阻止濃度は  $10^{-3} \text{M}$  であつた。しかし Procaine は被検物中最も弱く、完全阻止濃度は  $10^{-2} \text{M}$  であつた。

## 考

上記の実験によつて、TE 凝集反応に対する各種イオンの影響として、1価 Cation が高濃度で多少増強的影響を示し、2価 Cation は濃度によつて阻止・増強の2相性影響を示すが、Anion は殆んど影響がないことが確かめられた。しかしこれらイオンの中には、伊藤等<sup>2)</sup>が最近  $Mn^{++}$  イオンに認めたような強大な阻止作用を呈するものはなかつた。なお重金属塩の殆んどがそれ自身タンニン酸処置赤血球に対し強い凝集作用をもっているため、その影響を検索することはできなかつた。

免疫学の領域においては、細菌の凝集反応や蛋白質の沈降反応が種々のイオンによつて影響を受けることは周知のことであつて、このことからこれらの免疫反応では、コロイド化学におけるコロイド粒子の状態変化と同様に、抗元—抗体反応の結果起こつた静電気学的な荷電状態の変化が重要な意義をもつものであるとされている。TE 凝集反応とイオンとの関係については、緒言にも述べた如く、伊藤等<sup>2)</sup>は陽イオン交換樹脂をもつてモルモット血清を処理すると、血清の凝集活性が消失することを観察し、また山崎<sup>3)</sup>は TE 凝集反応に対して EDTA が阻止効果を呈するが、クエン酸は全く影響がないことを確かめている。これらの結果から TE 凝集反応に何らかのイオンが関与しているようにも解されるのであるが、上に述べた著者の実験からは TE 凝集反応の成立に関し特に重要な意義をもつと思われるイオンの存在を明示するような成績は得られなかつた。ただし TE 凝集反応では食塩水をメヂウムとしており、しかも  $Na^+$  イオン、 $Cl^-$  イオンを含まないで赤血球のタンニン酸処置を行なうに適した等張メヂウムがなかつたため、 $Na^+$  イオン、 $Cl^-$  イオンの意義については明らかにすることができなかつた。唯、本研究の実験成績で、TE 凝集反応の機序に関連して多少とも注目されるのは次の諸点である。

## 察

(1) 1価 Cation と 2価 Cation とが互いに相異なる影響を示したこと。ここで、これとはなはだ類似したイオン効果が最近 Askari<sup>4)</sup>によつて報告されていることを指摘しておこう。即ち Askari は赤血球細胞膜中に存在する酵素 5'-Adenylic acid desaminase に対する各種イオンの影響について検索して、この酵素が  $K^+$ 、 $Na^+$ 、 $NH_4^+$ 、 $Li^+$  及び  $Rb^+$  イオン等の 1価 Cation によつて著しく活性化されるが、これに反して  $Mg^{++}$  及び  $Ca^{++}$  イオン等の 2価 Cation は全く無効であることを実証した。

(2) 2価 Cation が濃度によつて阻止あるいは増強の2相性影響を示したこと。重金属等の Cation が細胞の生活作用や、酵素の活性に対して濃度によつて、相反した複雑な2相性影響（阻止または増強）を及ぼすことが古くから知られている<sup>5)</sup>。

(3) 抗ヒスタミン剤、Procaine 及び Quinidine が抑制効果を呈したこと。この事実はこれらの薬物が細胞膜の Adenosinetriphosphatase (ATPase) の働きと結びついた  $Na^+$  イオン及び  $K^+$  イオンの active transport に対して阻止作用を有するものであることにかんがみてはなはだ興味深いものがある。

以上3つの実証から推測されることは、TE 凝集反応の発現機序の中に酵素的な要因——それが赤血球成分の中にあるか、あるいは血清中に含まれているかは別問題として——が介在しているのではなからうかということである。これに関連して想起されるのは、TE 凝集反応がモノヨード酢酸、マロン酸及び 2,4-Dinitrophenol のような酵素毒によつて阻止されるという山崎<sup>3)</sup>の実証である。しかし他方、上記薬物と同じく赤血球細胞膜 ATPase の働きに直結した  $Na^+$  及び  $K^+$  イオンの active transport に強力な阻止作用を呈する強心配糖体の場合には、Ouabain と K-Storphanthin とでは異なつた結果が得られたことは、上述の推測に合致し

ない。

ともあれ、タンニン酸処置による赤血球細胞膜の理化学的性状や<sup>10,11)</sup>、血清中の活性因子の多元性<sup>1)</sup>等の基本的問題が解決されない現状で

は、これまでに得られた実験結果から TE 凝集反応におけるイオンの意義について明言できる段階ではない。

## 結 論

TE 凝集反応に対する 諸種イオンの影響について検索して次の結果を得た。

1.  $\text{Li}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Rb}^+$ ,  $\text{Cs}^+$  及び  $\text{NH}_4^+$  イオン等の 1 価 Cation は高濃度 ( $10^{-1}\text{M}$ ) において多少増強的影響を示した。

2.  $\text{Mg}^{++}$ ,  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Sr}^{++}$  及び  $\text{Ba}^{++}$  イオン等の 2 価 Cation は濃度によつて異なつた影響を示し、高濃度 (約  $10^{-2}\text{M}$ ) では著明な阻止作用を示し、またそれより低い濃度では増強作用を示した。

Table 1  
Effect of monovalent cations on TE-agglutination

Salt	Time of reading (min.)	Molar concentration of salt							Control (without salt)
		$10^{-1}$	$5 \times 10^{-2}$	$2 \times 10^{-2}$	$10^{-2}$	$5 \times 10^{-3}$	$2 \times 10^{-3}$	$10^{-3}$	
LiCl	5	—	—	—	—	—	—	—	—
	10	—	—	—	—	—	—	—	—
	15	±	++	±	—	—	—	—	—
	20	++	++	±	±	±	—	—	—
	25	##	##	+	+	±	±	±	±
KCl	5	—	—	—	—	—	—	—	—
	10	—	—	—	—	—	—	—	—
	15	±	±	±	—	—	—	—	—
	20	##	##	±	±	±	±	±	±
	25	##	##	++	+	+	+	±	±
CsCl	5	—	—	—	—	—	—	—	—
	10	—	—	—	—	—	—	—	—
	15	—	—	±	±	—	—	—	—
	20	—	—	±	±	±	±	—	—
	25	—	±	+	+	±	±	±	±
RbCl	5	—	—	—	—	—	—	—	—
	10	—	—	—	—	—	—	—	—
	15	±	±	±	—	—	—	—	—
	20	##	##	±	±	±	±	±	±
	25	##	##	++	+	+	±	±	±
$\text{NH}_4\text{Cl}$	5	—	—	—	—	—	—	—	—
	10	—	—	—	—	—	—	—	—
	15	±	+	±	±	±	—	—	—
	20	##	##	++	+	±	±	—	—
	25	##	##	##	++	++	+	±	±

3.  $\text{Br}'$ ,  $\text{I}'$ ,  $\text{SO}_4''$ ,  $\text{NO}_2'$ ,  $\text{NO}_3'$ ,  $\text{ClO}_3'$ ,  $\text{SCN}'$  及び  $\text{CH}_3\text{COO}'$  イオン等の Anion は殆んど影響を呈しなかつた。

4. 細胞膜のイオン透過性に影響を及ぼす薬物について行なつた検索では、Ouabain は無効

であつたが、K-Strophanthin, 抗ヒスタミン剤 Procaine 及び Quinidine は  $10^{-3}\text{M}$  程度の濃度で阻止作用を呈した。

本研究の遂行には 文部省 科学研究費の補助を受けた。

## 文 献

- 1) Ito, R., & Akiyama, M. : Jap. J. Tuberc., 10, 102, 1962; Amer. Rev. Resp. Dis., 88, 553, 1963; Nature, 200, 791, 1963. 2) 山崎隆吉 : 金大結研年報, 21(下), 259, 1963. 3) 伊藤亮 : (未発表). 4) Boyden, S. V. : J. Exp. Med., 93, 107, 1951. 5) Repke, K., und Portius, H. J. : Experientia, 19, 452, 1963. 6) Judah, J. D. : Biochim. Biophys. Acta, 53, 375, 1961. 7) Lorkovic,

- H. : Arch. int. Pharmacodyn., 146, 266, 1963. 8) Askari, A. : Science, 141, 44, 1963. 9) Clark, A. J. : Heffter's Handb. exper. Pharmacol., Erg.-Werk, 4, 48, 1937. 10) Handovsky, H., und Heubner, W. : Arch. Exp. Path. Pharmacol., 99, 123, 1923. 11) Hunter, F. R. : J. Cell. Comp. Physiol., 55, 175, 1960.

Table 2  
Effect of divalent cations on TE-agglutination

Salt	Time of reading (min.)	Molar concentration of salt										Control (without salt)
		$10^{-1}$	$5 \times 10^{-2}$	$2 \times 10^{-2}$	$10^{-2}$	$5 \times 10^{-3}$	$2 \times 10^{-3}$	$10^{-3}$	$5 \times 10^{-4}$	$2 \times 10^{-4}$	$10^{-4}$	
$\text{MgCl}_2$	5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	10	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	15	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	20	—	—	—	±	+	±	±	±	±	±	—
	25	—	—	—	±	++	+	±	±	±	±	±
$\text{CaCl}_2$	5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	10	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	15	—	—	—	—	—	—	±	±	—	—	±
	20	—	—	—	—	—	—	±	±	±	±	±
	25	—	—	—	—	—	±	++	+	±	±	±
$\text{SrCl}_2$	5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	10	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	15	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	20	—	—	—	±	+	±	±	—	—	—	—
	25	—	—	—	++	++	++	++	—	—	—	—
$\text{BaCl}_2$	5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	10	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	15	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	20	—	—	—	±	±	±	±	±	—	—	—
	25	—	—	—	±	±	±	±	±	±	±	±

Table 3  
Stimulating effect of divalent cations on TE-agglutination

Salt	Medium	Molar concentration of salt									Control (without salt)
		$10^{-1}$	$5 \times 10^{-2}$	$2 \times 10^{-2}$	$10^{-2}$	$5 \times 10^{-3}$	$2 \times 10^{-3}$	$10^{-3}$	$5 \times 10^{-4}$	$2 \times 10^{-4}$	
MgCl <sub>2</sub>	with addition of serum	—	—	++	++	±	—	—	—	—	—
	without serum	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
CaCl <sub>2</sub>	with addition of serum	—	—	—	±	+	±	—	—	—	—
	without serum	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
SrCl <sub>2</sub>	with addition of serum	—	—	##	##	+	—	—	—	—	—
	without serum	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
BaCl <sub>2</sub>	with addition of serum	—	—	++	++	+	±	—	—	—	—
	without serum	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Table 4  
Effect of anions on TE-agglutination

Salt	Molar concentration of salt								Control (without salt)
	$10^{-1}$	$5 \times 10^{-2}$	$2 \times 10^{-2}$	$10^{-2}$	$5 \times 10^{-3}$	$2 \times 10^{-3}$	$10^{-3}$	$5 \times 10^{-4}$	
MgCl <sub>2</sub>	—	—	—	±	++	+	±	±	±
MgSO <sub>4</sub>	—	—	—	±	++	+	±	±	±
KCl	##	##	++	+	±	±	±	±	±
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	##	##	##	++	+	±	±	±	±
KNO <sub>3</sub>	##	##	±	±	±	±	±	±	±
NH <sub>4</sub> Cl	##	##	##	++	+	±	±	±	±
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	##	##	##	##	++	±	±	±	±
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	##	##	##	±	±	±	±	±	±

Table 5  
Effect of anions on TE-agglutination

Salt	Molar concentration of salt							Control (without salt)
	$10^{-1}$	$5 \times 10^{-2}$	$2 \times 10^{-2}$	$10^{-2}$	$5 \times 10^{-3}$	$2 \times 10^{-3}$	$10^{-3}$	
KCl	##	##	++	+	±	±	±	±
KBr	##	##	++	+	+	+	+	+
KI	++	++	+	+	+	+	+	+
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	##	##	++	++	+	+	+	+
KNO <sub>3</sub>	##	##	++	+	+	+	+	+
KNO <sub>2</sub>	##	##	++	++	+	+	+	+
KClO <sub>3</sub>	##	##	++	+	+	+	+	+
KSCN	+	+	+	+	+	+	+	+
Kalium acetate	##	##	++	+	+	+	+	+



Table 6  
Combined effect of mono- and divalent cations on TE-agglutination

Salt	Molar concentration of salt									Control (without salt)
	$10^{-1}$	$5 \times 10^{-2}$	$2 \times 10^{-2}$	$10^{-2}$	$5 \times 10^{-3}$	$2 \times 10^{-3}$	$10^{-3}$	$5 \times 10^{-4}$	$2 \times 10^{-4}$	
CaCl <sub>2</sub> KCl	—	—	—	—	—	+	++	++	+	+
CaCl <sub>2</sub> NH <sub>4</sub> Cl	—	—	—	+	+	++	+	+	+	+
MgCl <sub>2</sub> KCl	—	—	—	±	+	++	+	+	±	+
MgCl <sub>2</sub> NH <sub>4</sub> Cl	—	—	—	—	—	±	±	+	+	+
CaCl <sub>2</sub>	—	—	—	—	—	+	++	++	+	+
MgCl <sub>2</sub>	—	—	—	+	++	++	++	+	+	+
KCl	++	++	++	++	++	+	+	+	+	+
NH <sub>4</sub> Cl	±	+	+	+	+	+	±	±	±	+

Table 7  
Effect of cardiac glycosides on TE-agglutination

Cardiac glycosides	Time of reading (min.)	Molar concentration of cardiac glycosides								Control (without glycoside)
		$2 \times 10^{-3}$	$10^{-3}$	$5 \times 10^{-4}$	$2 \times 10^{-4}$	$10^{-4}$	$5 \times 10^{-5}$	$2 \times 10^{-5}$	$10^{-5}$	
Ouabain	5	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	10	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	15	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	20	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	25	++	++	++	++	++	++	++	++	++
K-Strophanthin	5	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	10	—	—	—	—	—	—	—	—	±
	15	—	—	—	±	±	±	±	±	±
	20	—	—	±	±	±	±	±	+	+
	25	—	—	±	+	+	+	++	++	++

Table 8  
Effect of K-strophanthin on TE-agglutination in the presence of K<sup>+</sup>ions

Concentration of KCl in the medium	Molar concentration of K-strophanthin									Control (without glycoside)
	$5 \times 10^{-3}$	$2 \times 10^{-3}$	$10^{-3}$	$5 \times 10^{-4}$	$2 \times 10^{-4}$	$10^{-4}$	$5 \times 10^{-5}$	$2 \times 10^{-5}$	$10^{-5}$	
$10^{-2}$ M	—	—	—	—	+	++	++	++	++	++
$10^{-3}$ M	—	—	—	—	++	++	++	++	++	++
$10^{-4}$ M	—	—	—	—	++	++	++	++	++	++
without KCl (control)	—	—	—	—	++	++	++	++	++	++

Table 9

Effect of  $\text{Ca}^{++}$  and  $\text{K}^+$  on TE-agglutination in the presence of ouabain

Medium	Salt	Molar concentration of salt									Control (without salt)
		$10^{-1}$	$5 \times 10^{-2}$	$2 \times 10^{-2}$	$10^{-2}$	$5 \times 10^{-3}$	$2 \times 10^{-3}$	$10^{-3}$	$5 \times 10^{-4}$	$2 \times 10^{-4}$	
Saline containing $5 \times 10^{-4}$ M ouabain	$\text{CaCl}_2$	—	—	—	±	##	##	##	++	++	+
	KCl	##	##	##	##	##	++	++	/	/	+
Saline without addition of ouabain	$\text{CaCl}_2$	—	—	—	±	##	++	++	++	++	++
	KCl	##	##	##	++	++	++	++	/	/	++

Table 10

Effect of antihistamines, procaine and quinidine on TE-agglutination

Compound	Molar concentration of compound									Control
	$2 \times 10^{-2}$	$10^{-2}$	$5 \times 10^{-3}$	$2 \times 10^{-3}$	$10^{-3}$	$5 \times 10^{-4}$	$2 \times 10^{-4}$	$10^{-4}$	$5 \times 10^{-5}$	
Promethazine	/	h*	h	—	—	—	—	++	++	++
Dimenhydrinate	/	h	—	—	—	++	++	++	++	++
Chlorhetramine	/	—	—	—	±	±	±	+	++	++
Diphenhydramine	/	h	—	—	—	+	++	++	++	++
Procaine	—	—	±	±	±	+	±	++	/	++
Quinidine	h	—	—	—	—	++	++	++	/	++

\* h=Hemolysis.